

POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS –HPA-1 E A DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA

Deisiany Gomes Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Natália Mestre Braz (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Josiane Bazzo de Alencar (pesquisadora), Ana Maria Sell (Orientadora), e-mail: ra101133@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia/Imunogenética.

Palavras-chave: Polimorfismo, Biologia molecular, Estudo de Associação

Resumo

A Doença Periodontal Crônica possui um caráter multifatorial e a resposta imunológica do hospedeiro é um fator determinante para o progresso da doença. Devido à participação das plaquetas no processo de reparação da injúria tecidual e o polimorfismo nos genes que codificam o HPA-1, viu-se necessário avaliar se este polimorfismo influencia diretamente na patogênese da DPC. No presente estudo caso-controle, foram selecionados pacientes não fumantes, e aqueles com doenças imunoinflamatórias e diabetes foram excluídos na seleção da amostra. Em cada indivíduo, 10 mL de sangue foram coletados. O DNA foi extraído pelo método salting-out, que posteriormente foi analisado pela medida da densidade ótica no equipamento NanoDrop 2000™. A genotipagem foi executada pela técnica de PCR-SSP e para a amplificação foram utilizados primers específicos, combinado com um primer complementar comum. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese. Para a análise da distribuição genotípica foi utilizado o software SNPStats. No entanto, diferenças na distribuição dos alelos e genótipos não foram observadas entre casos e controles. Concluindo que o polimorfismo no antígeno plaquetário humano HPA-1 não foi associado ao desenvolvimento da doença periodontal crônica em pacientes do Noroeste do Paraná.

Introdução

As doenças periodontais crônicas (DPC) consistem em processos inflamatórios crônicos e multifatoriais que acometem os tecidos de suporte do dente (periodonto) (PIHLSTROM et al., 2005; YOSHIE et al., 2007). Inicia-se com a formação de uma placa bacteriana na região da gengiva e em resposta, o sistema imunológico é acionado, induzindo uma reação inflamatória (BORRELL & PAPAPANOU, 2005; SUSIN et al., 2005). As plaquetas participam desse processo combatendo a injúria endotelial, sua função é mediada por receptores de glicoproteínas de membrana plaquetária (GP) que carregam antígenos plaquetários humanos (HPA), cujos genes são polimórficos (YU et al., 2011; WEHNER et al. 2017). O objetivo do projeto foi

avaliar a influência do polimorfismo do HPA-1 na patogênese da DPC em pacientes do Noroeste do Paraná.

Materiais e métodos

O estudo foi realizado em um grupo de 101 pacientes com DPC e outro grupo de 101 controles (sem DPC) selecionados após avaliação clínica nas clínicas odontológicas das instituições Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Centro Universitário UNINGÁ. Todos os indivíduos foram esclarecidos sobre a natureza do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana da UEM (COPEP nº 719/2011 e CAAE 1.866.509/2016).

Como requisito para seleção dos pacientes e controles, os indivíduos deveriam ser não fumantes, ter idade entre 30 e 65 anos, possuir arcada dentária com no mínimo 20 dentes; os pacientes com DPC deveriam apresentar pelo menos 5 sítios em diferentes dentes com presença de bolsa periodontal maiores ou iguais a 5mm e perda de inserção maiores ou iguais a 3mm; e os controles deveriam apresentar saúde periodontal: menos de 30% de sangramento à sondagem e nenhuma bolsa maior do que 4mm. Pacientes com quadro de doença periodontal agressiva, infecção aguda, diabetes, fumantes e que fizeram tratamento periodontal nos últimos 6 meses foram excluídos do projeto para eliminar os riscos desses fatores ocultar a relação polimorfismo doença.

Cerca de 10 mL de sangue foram coletados em tubos contendo EDTA. O DNA foi por meio do método salting-out, que foram posteriormente analisados em espectrofotômetro no equipamento NanoDrop 2000™ (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

A genotipagem foi executada pela técnica de PCR-SSP e para a amplificação foram utilizados primers específicos que diferem em apenas um nucleotídeo na posição final 3', combinado com um primer complementar comum. Como controle interno da reação foi utilizado o gene do hormônio de crescimento humano que amplifica um fragmento de 434 pb. O volume final da reação foi de 12,5 µL. A amplificação foi realizada em termociclador System 9700 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e condições de ciclagem: 32 ciclos 94°C / 5 min, 95°C / 40s, 65°C / 50s, 72°C / 40s, 72°C / 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY).

Para a análise da distribuição genotípica entre as frequências observadas e esperadas, se as amostras estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e a possível associação entre polimorfismos genéticos e a DPC foi utilizado o software SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>), Teste de Qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher. A Odds Ratio foi calculada com um intervalo de confiança de 95% para um valor de P significativo usando o mesmo software. Todos os testes foram procedidos ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A distribuição das frequências alélicas e genóticas dos SNPs avaliados estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo selvagem (A) do polimorfismo no gene do antígeno plaquetário humano HPA -1 foi mais frequente tanto em casos como em controles, não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Frequências alélicas do polimorfismo no gene do *HPA-1* em pacientes com doença periodontal crônica e controles.

Alelos	Casos	Controles
	n (f)	n (f)
	N = 101	N = 101
<i>HPA-1</i>		
A	178 (0,88)	170 (0,84)
B	24 (0,12)	32 (0,16)

O genótipo selvagem homozigoto A/A foi também bastante frequente em casos (78%) bem como em controles (72%). Para os genótipos A/B e B/B de ambos as frequências foram semelhantes em pacientes e controles e os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Frequências genóticas do polimorfismo no gene do *HPA-1* em pacientes com doença periodontal crônica e controles.

Genótipos	Casos	Controles
	n(f)	n(f)
	N = 101	N = 101
<i>HPA-1</i>		
A/A	79 (0,78)	72 (0,71)
A/B	20 (0,20)	26 (0,26)
B/B	2 (0,02)	3 (0,03)

A DPC possui um caráter multifatorial, sendo que a resposta imunológica do hospedeiro frente à ação bacteriana parece ser um fator determinante para o progresso da doença. Devido à participação das plaquetas no processo de injúria endotelial e o polimorfismo nos genes que codificam o HPA-1, viu-se necessário avaliar se esse polimorfismo influencia diretamente na patogênese da DPC.

No presente estudo observou-se que a frequência do alelo A foi semelhante em ambos os grupos, bem como a homozigosidade genotípica A/A também foi predominante. Desta forma, não foram encontradas inconsistências em relação aos resultados encontrados quando comparados a outros trabalhos de referência.

Porém, diante dos dados observados neste estudo infere-se que um polimorfismo nos genes que codificam o HPA-1 não influenciou na patogênese da DPC, entretanto não se deve descartar a possibilidade de avaliar em uma amostra maior.

Uma investigação dos polimorfismos destes genes é importante para melhor prever o risco de desenvolvimento da DPC e assim traçar um perfil da população do Noroeste do Paraná para posterior investimento na terapêutica e no diagnóstico.

Conclusões

Diferenças na distribuição dos alelos e genótipos não foram observadas entre os pacientes de casos e controles. Desta forma, neste estudo foi observado que o polimorfismo no gene que codifica o HPA-1 não influenciou na patogênese da DPC. Concluindo, o polimorfismo no antígeno plaquetário humano – HPA-1 não foi associado ao desenvolvimento da doença periodontal crônica em pacientes do Noroeste do Paraná.

Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária, ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG – UEM) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM). Agradeço a todos que participaram e ajudaram no projeto, especialmente aos pacientes e controles. Agradeço à minha orientadora e à minha família pelo apoio.

Referências

- 1- BORRELL, L. N., & PAPAPANOU, P. N. Analytical epidemiology of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32. N. s6, p. 132-158, 2005.
- 2- PIHLSTROM, B. L., MICHALOWICZ, B. S., & JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005.
- 3- SUSIN, C., VALLE, P., OPPERMANN, R. V., HAUGEJORDEN, O., & ALBANDAR, J. M. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. **Journal of clinical periodontology**, v. 32, n. 2, p. 123-129, 2005.
- 4- WEHNER, C., JANJIC, K., & AGIS, H. Relevance of the plasminogen system in physiology, pathology, and regeneration of oral tissues—From the perspective of dental specialties. **Archives of Oral Biology**, v. 74, n. 136-145, 2017.
- 5- YOSHIE, H., KOBAYASHI, T., TAI, H., & GALICIA, J. C. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 43, n. 1, p. 102-132, 2007.
- 6- YU, K. M., INOUE, Y., UMEDA, M., TERASAKI, H., CHEN, Z. Y., & IWAI, T. The periodontal anaerobe Porphyromonas gingivalis induced platelet activation and increased aggregation in whole blood by rat model. **Thrombosis research**, v. 127, n. 5, p. 418-425, 2011.